

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY  
V PRAZE**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

# **Exprese T $\beta$ RII:Fc z rekombinantního viru Vakcinie**

Zuzana Samková

Školitelka: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.

Laboratoř rekombinantních vakcín  
Ústav hematologie a krevní transfuze

**Praha, 2007**

Děkuji své školitelce RNDr. Šárce Němečkové, DrSc. a Mgr. Kamile Žůrkové za poskytnutí cenných rad a trpělivost.

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Abstrakt</b> .....	4
<b>2.</b>	<b>Klíčová slova</b> .....	5
<b>3.</b>	<b>Seznam zkratk</b> .....	5
<b>4.</b>	<b>Úvod</b> .....	7
<b>5.</b>	<b>Virus vakcinie</b>	
5.1.	Úvod .....	8
5.2.	Struktura .....	8
5.3.	Životní cyklus .....	9
5.4.	Transkripce .....	10
5.5.	Replikace .....	11
5.6.	Interakce s hostitelskou buňkou .....	12
5.6.1.	Cytopatický efekt .....	12
5.6.2.	VV vs. imunitní systém .....	12
5.7.	VV rekombinantní vektory .....	13
<b>6.</b>	<b>Receptor typu II pro transformující růstový faktor <math>\beta</math> ( T<math>\beta</math>RII )</b>	
6.1.	Charakteristika TGF $\beta$ .....	15
6.2.	Charakteristika TGF $\beta$ receptorů .....	16
6.3.	Role TGF $\beta$ při nádorové transformaci .....	18
6.3.1.	Mutace v TGF $\beta$ signální dráze .....	18
6.3.2.	Potlačení protinádorové imunitní odpovědi .....	19
6.3.3.	Podpora angiogeneze .....	20
6.4.	Terapie nádorů - blokování TGF $\beta$ signální dráhy .....	21
<b>7.</b>	<b>Fc:IgG1 fúzní proteiny</b>	
7.1	Charakteristika Fc fragmentu IgG1 .....	22
7.2	Fc fúzní proteiny .....	23
<b>8.</b>	<b>Závěr</b> .....	25
<b>9.</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	26

## 1. Abstrakt

TGF $\beta$  má při karcinogenezi dvojí roli. V počátku slouží jako nádorový supresor, během růstu nádoru se však jeho funkce mění na nádorový promotor a buňky nádoru i jeho mikrookolí produkují velké množství TGF $\beta$ . Tento nádorový TGF $\beta$  poskytuje vhodné prostředí pro růst a šíření nádoru. Jedním ze způsobů, jak kontrolovat růst nádoru a metastáze, je blokování TGF $\beta$  signální dráhy v pokročilých stádiích karcinogeneze. Pro tyto účely se zkoumají monoklonální protilátky, rozpustné receptory, dominantní negativní receptory, antisense oligonukleotidy a malé molekuly inhibující funkce receptorových kináz. Rozpustné receptory (sT $\beta$ RII) jsou fúzovány s Fc fragmentem IgG1, který zvyšuje export proteinů z buněk, zajišťuje vytvoření homodimeru a tím i lepší vazbu s TGF $\beta$ . Práce popisuje virus vakcinie jakožto vhodný expresní vektor pro terapii nádorů, roli TGF $\beta$  při nádorové transformaci a blokování TGF $\beta$  signální dráhy v pokročilých stádiích karcinogeneze. Na závěr jsou zmíněny výhody Fc fúzních proteinů.

## Abstract

TGF- $\beta$  has a biphasic role in tumorigenesis. In early phases, when cells still respond to the growth inhibitory effects of TGF $\beta$ , it may act as tumor suppressor. However, in late phases, when cells have escaped selectively from the antimitogenic response of TGF $\beta$ , and tumor cells often start to secrete high amounts of TGF- $\beta$ , it may act as a promoter of tumor progression and invasion. One way of control tumour formation and progression is blocking of TGF $\beta$  signalling pathways in late phases of tumorigenesis. Several strategies including the use of monoclonal antibodies, soluble receptors, dominant negative receptors, anti-sense oligonucleotides and small drug-molecules to inhibit T $\beta$ RI kinase have shown promising results in preclinical studies. Soluble receptors (sT $\beta$ RII) are fused to the Fc region of an IgG1 which increases proteins export from cells, enables formation of homodimer thereby better binding with TGF $\beta$ . This review describes vaccinia virus as a suitable vector for cancer therapy, a role of TGF $\beta$  in tumorigenesis and blocking of TGF $\beta$  signalling pathways in late phases of tumorigenesis. There are also mentioned advantages of Fc- fusion proteins at the end.

## 2. Klíčová slova

Terapie nádorů, Virus vakcinie, TGF $\beta$ , T $\beta$ RII, Fc IgG1 fúzní proteiny

## 3. Seznam zkratk

AAV	Adeno-asociovaný virus
ADCC	Na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita
ALK5	Aktivinu podobná kináza
APC	Antigen prezentující buňky
CEV	S buňkou asociovaný obalený virion
CDC	Na komplementu závislá cytotoxicita
CDK	Cyklin dependentní kináza
Co-Smads	Běžné-zprostředkovávající Smads
CTGF	Růstový faktor pojivových tkání
CTL	Cytotoxické T lymfocyty
DNR	Dominantní negativní receptory
EEV	Extracelulární obalený virion
EGF	Epidermální růstový faktor
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
EMT	Epiteliální- mezenchymální transformace
ERK	Extracelulární signál-regulující kináza
FcRn	Neonatální Fc-receptor
Fc $\gamma$ R	Receptor pro Fc fragment
GDEPT	Gene-direct enzyme pro-drug therapy
HLA- A201	Lidský leukocytární antigen A201
HPV 16	Lidský papillomavirus typu 16
IEVs	Intracelulární obalené viriony
IgG1	Imunoglobulin G1
IMV	Intracelulární maturovaný virion
ITR	Invertované koncové repetice
IVs	Nematurované viriony
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminální kináza
LAP	Latentně asociovaný protein
LTBP	Latentní TGF $\beta$ - vazebný protein
MAPK	p38 mitogenem-aktivovaná protein kináza
MVA	Modifikovaný virus Ankara
MHCgp I	Hlavní histokompatibilní komplex-glykoprotein I
MHCgp II	Hlavní histokompatibilní komplex-glykoprotein II
MMPs	Metaloproteinázy
NK	Přirození zabijedci
NPHI	Nukleozid fosfohydroláza I
PDGF	Růstový faktor krevních destiček
PI <sub>3</sub> K	Fosfatidylinositol-3 kináza

pRB	Retinoblastoma protein
p53	Protein 53
ROS	Reaktivní kyslíky (radikály)
R-Smads	Receptorem-regulované Smads
SARA	SMAD kotva pro aktivaci receptorem
sTβRII	Rozpustný receptor typu II pro transformující růstový faktor β
TGFα	Transformující růstový faktor α
TGFβ	Transformující růstový faktor β
TH <sub>1</sub>	Pomocné T lymfocyty 1
TH <sub>2</sub>	Pomocné T lymfocyty 2
TK	Tymidin kináza
TβRI	Receptor typu I pro transformující růstový faktor β
TβRII	Receptor typu II pro transformující růstový faktor β
TβRII:Fc	Fúzní protein TβRII:Fc
TβRIII	Receptor typu III pro transformující růstový faktor β
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VGf	Virový růstový faktor
VV	Vakcinia virus
WR	Western Reserve

#### 4. Úvod

Rozvinuté nádory obsahují kromě maligních buněk i buňky nemaligní, jako jsou nádorové myofibroblasty, endoteliální a zánětlivé buňky, které tvoří mikrookolí nádoru. Tyto buňky produkují velký počet růstových a regulačních faktorů, které mají pozitivní vliv na progresi nádorů a vytváří imunosupresivní prostředí, jenž brání rozpoznání nádorových antigenů a znesnadňuje imunoterapii nádorů.

Jedním z těchto faktorů je TGF $\beta$  produkovaný buňkami nádoru i buňkami nádorového mikrookolí. TGF $\beta$  slouží v časných stádiích karcinogeneze jako nádorový supresor, během růstu nádoru se však jeho funkce změní a stane se z něj nádorový promotor podporující imunosupresi, růst a šíření nádoru. Tento nádorový TGF $\beta$  je možné neutralizovat zvýšenou lokální expresí rozpustného receptoru sT $\beta$ RII, což má za následek zlepšení podmínek pro funkci protinádorových NK a T buněk. sT $\beta$ RII může být fúzován s Fc fragmentem IgG1, což vede ke zvýšení exportu produktu z buněk a k vytvoření homodimeru pro lepší vazbu s ligandem.

Rekombinantní virus vakcinie je vhodný pro použití při genové terapii nádorů. Jeho výhody spočívají ve vysoké hladině exprese, časově omezené expresi transgenu, nízkému riziku inzerce do hostitelského genomu a stimulaci humorální i buněčné imunity.

V této práci jsem se nejdříve zaměřila na charakteristiku viru vakcinie a od něj odvozených rekombinantních vektorů, dále na TGF $\beta$  a jeho receptory, dvojí roli TGF $\beta$  v karcinogenezi a použití TGF $\beta$  antagonistů při terapii nádorů; na závěr jsem se zmínila o výhodách Fc fúzních proteinů.

## 5. Virus Vakcinie

### 5.1. Úvod

Virus vakcinie (VV) patří do skupiny poxvirů. Jsou to velké DNA viry replikující se v cytoplazmě buněk obratlovců i bezobratlých. Z lidských patogenů mají největší význam virus variola a virus molluscum contagiosum. Variola, zvaná též virus černých neštovic, byla rozšířena po celém světě, první zmínky o jejím výskytu jsou z roku 1122 př.n.l. z Číny. V roce 1980 byly černé neštovice světovou zdravotnickou organizací prohlášeny za eradikované (HENDERSON MOSS 1999). VV byl jako první ze zvířecích virů mikroskopicky pozorován, přesně titrován, fyzicky purifikován a chemicky analyzován (MOSS 2001). Přesný původ VV je neznámý.

### 5.2 Struktura

Zralé viriony mají tvar cihly o rozměru 350×270 nm. Povrchová, 30-nm silná vrstva ohraničená membránou obaluje homogenní bikonkávní core, po jehož stranách se vyskytují laterální tělíška. Existují tři druhy infekčních virových partikulí: IMV (intracelulární maturovaný virion), EEV (extracelulární obalený virion) a CEV (s buňkou asociovaný obalený virion).

Genom tvoří lineární dsDNA o velikosti kolem 190 kbp, která je na obou koncích kovalentně spojená. Obsahuje 10 kbp dlouhé invertované koncové repetice (ITR). Na koncích ITR se vyskytuje vlásenka, která je variabilní v délce delecí, repeticí a transpozicí. Otevřené čtecí rámce se nepřekrývají a vyskytují se buď v centrální oblasti, pokud jsou vysoce konzervované a spojené s esenciálními replikačními funkcemi, nebo v koncových částech, pokud jsou variabilní a produkty jejich genů jsou spojené s interakcí s hostitelem. Infekční virová partikule obsahuje transkripční enzymy, které zajišťují syntézu a modifikaci mRNA, enzymy podílející se na skládání virionů, úpravě proteinů a balení DNA.



### 5.3 Životní cyklus

Přestože VV byl jako první z virů izolován a pozorován pod mikroskopem, jeho vstup do buňky není zcela objasněn. IMV vstupuje do buněk po fúzi s plazmatickou membránou nebo pomocí invaginačních váčků. EEV vstupuje do buněk endocytózou po disrupci vnější membrány, při které dojde k uvolnění IMV a k jeho fúzi s plazmatickou membránou. Vstup CEV se podobá EEV, pouze zůstává připojen na plazmatickou membránu rodičovské buňky a jeho šíření usnadňují aktinové mikroklky.

VV má široký hostitelský okruh a infikuje savčí buňky rozdílných typů, z čehož se usuzuje, že jeho receptor je exprimován většinou buněk a je vysoce konzervován či že existují rozdílné receptory na různých buňkách (CHUNG et al. 1998). Kandidáty na VV receptor jsou proteoglykany, receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) či chemokinový receptor. Bylo prokázáno, že se VV A27L membránový protein váže na heparan sulfát (CHUNG et al. 1998). Dále bylo prokázáno, že se VV D8L obalový protein váže na chondroitin sulfát (HSIAO et al. 1999). VV kóduje VGF (virový růstový faktor), který je homologní k EGF (epidermální růstový faktor) a k TGF $\alpha$  (transformující růstový faktor  $\alpha$ ) (BULLE 1988). Bylo prokázáno, že obsazení EGFR inhibuje VV infekci (EPPSTEIN 1985).

Po vstupu do cytoplazmy je virové core transportováno k blízkosti jádra, kde dochází k syntéze časné mRNA a k druhému rozbalení pomocí virem kódovaného proteinu. Poté dochází k replikaci virové DNA a k transkripci intermediálních a pozdních mRNA.

Formování virionu začíná tvorbou poloměsíčitých membránových útvarů. O původu této membrány se vedou spory. Podle první hypotézy vznikla tato membrána de novo nejasným mechanismem, protože nebyla nalezena podobnost s žádnou z buněčných membrán. Jednou z možností vzniku této membrány je její syntéza na hydrofobním proteinovém lešení (honeycomb lattice), které bylo pozorováno deep-etch skenovacím elektronovým mikroskopem (HEUSER 2005). Podle druhé hypotézy je tato membrána odvozena z endoplazmatického retikula či Golgiho aparátu.

Poloměsíčité útvary se uzavřou do kruhovitěho tvaru za vzniku nematurovaných virionů (IVs) s hustou nukleoproteinovou hmotou vloženou do granulární matrix. Kulaté IVs se mění na intracelulární maturované viriony (IMVs) ve tvaru cihly.

IMVs se pohybují od místa vzniku k okraji buňky po mikrotubulech pomocí A27L membránového proteinu. IMVs se uvolňují z buňky pouze po její lyzi, ale některé partikule jsou obaleny dalšími membránami odvozenými od trans-Golgi či pozdních endozómů, které obsahují virové proteiny. Tímto obalením vznikají intracelulární obalené viriony (IEVs) s 4 obalovými vrstvami.

IEVs jsou transportovány k periferii buňky po mikrotubulech. Protein zprostředkující spojení mezi IEVs a mikrotubuly není přesně znám, ale uvažuje se o virovém proteinu F12L (EIJL et al. 2002) a virovém proteinu A36R (WARD a MOSS 2004). IEVs fúzí s plazmatickou membránou a ztracují jednu vnější membránu. Uvolněné viriony se nazývají extracelulární obalené viriony (EEVs), nebo zůstávají asociované s buněčným povrchem a nazývají se s buňkou asociované obalené viriony (CEVs). CEVs umožňují přímé šíření z buňky do buňky, zatímco EEVs umožňují šíření viru na delší vzdálenosti. IMV a EEV se váží na rozdílné buněčné receptory, čímž se zvyšuje okruh hostitelských buněk. Při maturaci jsou důležité biochemické modifikace (proteolýza, vznik disulfidických můstků, fosforylace).

#### **5.4. Transkripce**

Enzymy pro transkripci genů jsou syntetizovány v pozdní fázi infekce a zabaleny do virové partikule, proto může transkripce časných genů začít ihned po vstupu viru do buňky. Časné mRNA kódují enzymy a faktory pro transkripci intermediárních genů, syntézu DNA a interakci s hostitelskou buňkou. Při časné transkripci se přepíše cca polovina všech virových genů (ODA a JOKLIK 1967).

Promotor pro transkripci časných genů má sekvenci AAAAAATGAAAAA/TA. Iniciace transkripce začíná 12-17 nukleotidů od promotoru ve směru transkripce a je ATP dependentní. Transkripce končí 20- 50 bp za terminačním signálem TTTTNT a vyžaduje capping enzymy a NPHI (nukleozid fosfohydroláza I) (CHRISTEN et al.1998). Virová RNAPol se podobá eukaryotické, skládá se z osmi podjednotek o velikosti 7- 147 kDa. S RNAPol asociuje protein RAP94 ve spojení s VETF. VETF (heteromerní protein skládající se ze 2 podjednotek) se váže na promotory časných genů a zajišťuje ATPázovou aktivitu. VETF a RAP94 jsou funkčními analogy buněčných proteinů TFIID a TFIIF.

Capping enzymový komplex je důležitý pro terminaci transkripce, vznik čepičky (cap) na 5' konci mRNA a plní funkci RNA trifosfatázy, RNA guanyltransferázy a RNA metyltransferázy. Enzym katalyzující vznik koncového polyA je heterodimer skládající se z 55- a 39-kDa podjednotek VP55 a VP39.

Intermediární geny jsou exprimovány po replikaci virové DNA díky produktům časných genů. Bylo identifikováno 7 intermediárních genů, jejichž produkty jsou nutné pro expresi pozdních genů. Promotor obsahuje sekvenci TAAAT. Transkripce vyžaduje nově syntetizovanou RNA polymerázu bez RAP94 podjednotky a časné transkripční faktory. RNA pol nerozpoznává terminační signál, proto je 3' konec intermediárních mRNA heterogenní. Na transkripci intermediárních genů se podílí také buněčný protein VITF-2, u něhož dosud není znám mechanismus přesunu z jádra do cytoplasmy.

K transkripci pozdních genů dochází po vzniku intermediárních genů. Produkty pozdních genů jsou stavební proteiny a transkripční faktory pro geny časné. Promotor se podobá promotoru intermediárních genů. Transkripce vyžaduje nově syntetizovanou RNAPol bez RAP94 podjednotky a intermediární transkripční faktory. Na 5' konci pozdních mRNA je čepička s polyA-zaváděcí sekvencí vzniklé klouzáním RNAPol na TAAAT sekvenci promotoru.

## 5.5. Replikace

DNA replikace probíhá v cytoplazmě hostitelských buněk v blízkosti organizačního centra mikrotubulů. Začíná po transkripci časných genů cca 1-2 hodiny po infekci. VV kóduje enzymy metabolismu DNA, mezi které patří thymidinkináza, thymidylátkináza, ribonukleotid-reduktáza a dUTPáza.

Přesný mechanismus replikace není doposud znám, jedním z možných modelů je, že DNA replikace začíná zlomem v jedné či obou koncových vlásenkách, následuje přidávání nukleotidů na volný 3' konec, vytěšňování řetězce a vznik intermediárních kontaktemerů, které jsou spojeny zdvojenou vlásenkou a jejich rozštěpení je pravděpodobně zajištěno virovou topoizomerázou 1 a nicking-joining enzymem (K4L) (ECKERT et al. 2005).

Virová DNA pol má celkovou hmotnost cca 110 kDa a kromě funkce polymerázy má také asociovanou 3' exonukleázovou aktivitu. Mezi další virové proteiny účastníci se replikace DNA patří DNA-nezávislá nukleozid trifosfatáza (D5R), serin-threonin kináza (B1R), uracil DNA glykosyláza (D4R), H5R a A20R genové produkty formující proteinový komplex (ISHII a MOSS 2002).

Uvnitř buněk infikovaných VV dochází ve velké míře k homologní rekombinaci. Rekombinace nevyžaduje produkty pozdních genů a nejspíše je spojená s replikací. Díky nerovnoměrnému crossing-overu dochází k variabilitě v počtu tandemových repetice, k delecím a translokacím. Homologní rekombinace se využívá při tvorbě rekombinantních vektorů odvozených od VV.

## **5.6. Interakce s hostitelskou buňkou**

### **5.6.1. Cytopatický efekt**

V infikovaných buňkách dochází k morfologickým a metabolickým změnám, které se nazývají cytopatický efekt. Mezi morfologické změny patří změna v permeabilitě membrány či změny v cytoskeletu vedoucí k zakulacení buněk a ke vzniku syncytií. VV také indukuje pohyb infikovaných buněk ( SANDERSON et al. 1998). Přibližně 24 hodin po infekci dochází k lyzi infikovaných buněk.

### **5.6.2. VV vs. imunitní systém**

Hostitelský imunitní systém může zastavit šíření virové infekce mnoha mechanismy, kterým se viry snaží čelit různými způsoby. Bezprostředně po proniknutí viru do organismu se aktivují nespecifické imunitní reakce zahrnující interferony, komplement, cytokiny a NK buňky. Následně dojde k aktivaci cytotoxických T lymfocytů a také k tvorbě protilátek.

Virové obranné mechanismy se dají rozdělit do 3 tříd. Mezi první patří produkce virokinů, které napodobují cytokiny a jiné imunitní regulační molekuly. Do druhé třídy patří produkce viroreceptorů, které se podobají buněčným receptorům, ale ztratily transmembránovou kotvící sekvenci. Do třetí třídy patří intracelulární proteiny, které interferují s buněčnými signálními drahami.

<b>Protein</b>	<b>Typ modulace</b>	<b>Mechanismus</b>
A18R	Inhibice syntézy IFN	Regulace produkce dsRNA
B18R	IFN receptor	Rozpustný IFN $\alpha/\beta$ receptor
VH1	Inhibice IFN signalizace	Fosfatáza ruší aktivaci Stat1
E3L	Blokace funkce proteinů indukovaných IFN	Vazba dsRNA a blokace Pkr
A46R A52R	Inhibice TLR4 a Il-1 signální transdukce	Strukturně podobné Toll-like a Il-1 receptorům

**Tabulka č.1: Příklad VV proteinů modulujících imunitní systém hostitele**

Infekce VV inhibuje také maturaci dendritických buněk blokováním signální transdukční kaskády či cytokinové stimulace, neznámým mechanismem snižuje počet MHCgp I na povrchu buněk a ovlivňuje apoptózu infikovaných buněk genem SPI-2/B13R2 (serpin, homolog CrmA), který má vliv na aktivitu caspáz.

## **5.7. VV rekombinantní vektory**

V dnešní době není hlavní překážkou genové terapie nedostatek terapeutických genů, ale nedostatek vhodných systému pro doručení těchto genů do cílových buněk. Nejlepším systémem pro přenos terapeutických genů jsou dnes viry, které mohou být manipulovány k expresi těchto genů či ke specifické replikaci v hostitelských buňkách. Pro přechodnou transgenní expresi se používají virové vektory odvozené od adenovirů či VV a pro trvalou transgenní expresi vektory odvozené od retrovirů či AAV (adeno- associated virus).

VV byl téměř 200 roků používán na vakcinaci proti černým neštovicím a dnes je jednou z nejlépe charakterizovaných virových vakcín. VV má řadu výhodných vlastností - široký hostitelský okruh, vysoká míra exprese, kapacita pro vkládání velkého množství DNA (25 Kbp), nedochází k vložení do hostitelského genomu, relativně snadné vytvoření a izolace rekombinantních virů. Tyto vlastnosti vedly k využití VV jakožto expresního vektoru. Rekombinantní VV mají vlastnosti živých oslabených vakcín, prezentují antigeny přirozeným způsobem a stimulují humorální i buněčnou imunitu. CTL aktivita je ovlivněna volbou promotoru, při použití pozdních promotorů stimulují antigeny protilátkovou odpověď, ale nedochází k asociaci proteinů s MHCgpI pro rozeznání CTL,

protože VV inhibuje syntézu buněčných proteinů, mezi které patří i proteiny důležité pro vznik komplexu MHCgpl-antigen na povrchu buňky. Při použití časných promotorů dochází k aktivaci cytotoxických T lymfocytů.

Genom VV obsahuje 200 genů, z nichž přibližně 30% není esenciálních pro replikaci viru *in vitro*, ale mohou ovlivnit virulenci *in vivo*. Při tvorbě rekombinantních virů nelze přímo zavést cizí DNA do genomu VV, protože je příliš velký a purifikovaná virová DNA je neinfekční. Vhodné buňky je nutno transfekovat purifikovaným plasmidem a koinfikovat rodičovským virem. Přenos cizího genu z plazmidu do viru probíhá homologní rekombinací uvnitř infikovaných buněk. Exprese genu musí být řízena virovým promotorem, protože VV si kóduje vlastní polymerázu. Pro vysoký stupeň exprese se používá promotor pozdních genů kódující hlavní strukturní proteiny (např. 11kD protein), umělé promotory či hybridní systém založený na T7 RNA polymeráze. Inzerční místa se nacházejí nejvíce na koncích genomu, centrální oblast je více konzervovaná a obsahuje esenciální geny, ale i zde se nachází několik neesenciálních genů vhodných pro inzerci. Nejvíce se pro rekombinace využívá gen pro tymidin kinázu (TK) v koncové oblasti genomu.

Mezi nejvíce používané kmeny VV pro vznik rekombinantních vektorů patří laborotarní kmen Western Reserve (WR), vakcinační kmeny Kodaň, Wyeth, Lister, oslabené deriváty Lister, NYBH a Modifikovaný virus Ankara (MVA).

K přípravě bezpečných vakcín se deletují či inaktivují geny, které ovlivňují virulenci. Např. u kmene Kodaň dala delece 18 genů vznik vysoce oslabenému typu NYVAC. Jiným přístupem pro vznik vysoce oslabených vakcín je pasážování *in vitro*, např. MVA má mnohonásobné delece díky více než 500 pasážím na buňkách kuřecích embryí (MAYR et al. 1978). Využívá se také vložení cizího genu do VV TK, což vede ke snížení virulence.

Rekombinantní VV se také využívají při terapii nádorů. Vytvoří se buď nádorové vakcíny, jejichž imunostimulační vlastnosti iniciují imunitní odpověď proti nádorovým buňkám, nebo onkolytické viry, které jsou specificky cíleny do nádorových buněk. Využití VV jako vektoru pro genovou terapii je např. zvýšení imunogenicity transfekovaných buněk melanomu, kdy rekombinantní virus expimoval fúzní produkt ER cílového signálu a HLA-A201 vazebného 27-35 peptidu, infekce buněk melanomu tímto rekombinantním

virem měla za následek zvýšení CTL odpovědi *in vitro* (SCHUTZ et al. 2001). Dalším příkladem je rekombinantní VV exprimující protein p53, který po transfekci do gliomových buněk způsoboval vysoký stupeň apoptózy (TIMIRYASOVA et al. 2001).

Divoký VV není specifický pouze vůči nádorovým buňkám, pro zvýšení této specifity musí být modifikován. Jednou z možností zvýšení pro-nádorové specifity je delece TK genu. TK je konstitutivně exprimována v nádorových buňkách, zatímco v ostatních buňkách vzniká pouze během S a G<sub>2</sub> fáze buněčného cyklu.

Mezi další protinádorové metody patří „Gene-direct enzyme pro-drug therapy“ (GDEPT). Tato terapie zahrnuje naklonování enzymu do viru cíleného na nádory, poté je doručena pro-drug, kterou tento enzym aktivuje, tím dojde k uvolnění cytotoxické látky do mikrookolí nádoru. Mezi dva nejvýznamnější systémy patří herpes simplex virus thymidin kináza-ganciclovirový systém a cytosin deamináza-5-fluorocytosinový systém, kdy je gen pro cytosin deaminázu vložen do VV (převzato z THORNE et al. 2005).

## **6. Receptor typu II pro transformující růstový faktor $\beta$ ( T $\beta$ RII )**

### **6.1. Charakteristika TGF $\beta$**

Transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) byl poprvé identifikován v kultuře transformovaných myších fibroblastů a pojmenován podle schopnosti podporovat na podložce nezávislý růst buněčných linií (DE LARCO and TODARO 1978).

Skupina TGF $\beta$  se skládá z cca 30 strukturně podobných proteinů, do které patří izoformy TGF $\beta$ , růstové diferenciacní faktory, morfogenetické proteiny kostí, aktiviny, inhibiny a neurotrofní faktory. TGF $\beta$  je multifunkční regulátor, inhibuje buněčný růst, způsobuje apoptózu, stimuluje produkci extracelulární matrix, reguluje proliferaci, migraci buněk a ovlivňuje buňky imunitního systému. Deregulace jeho signální dráhy způsobuje mnoho lidských onemocnění, mezi které patří fibrózy, autoimunitní onemocnění a vznik nádorů.

Jsou známy 3 lidské izomery TGF $\beta$ , které sdílejí 75% homologie v aminokyselinové sekvenci, ale vykonávají rozdílné funkce. Monomerní formu TGF $\beta$  tvoří 4 antiparalelní  $\beta$ -řetězce a 3 intramolekulární disulfidické můstky tvořící cystinový

uzel. Monomery jsou spojeny přes N-terminální cystein do funkčního homodimeru či heterodimeru.

TGF $\beta$  je kódován ve formě prekurzoru, který obsahuje N-koncový signální peptid (20-30 AMK) pro sekreci z buněk, centrální oblast nazývaná se latentně asociovaný protein (LAP) a 112-114 AMK C-terminální oblast, ze které se proteolytickým štěpením stane maturovaná TGF $\beta$  molekula. Během sekrece je LAP odštěpen od TGF $\beta$ , ale zůstává k TGF $\beta$  nekovalentně asociován. Komplex LAP- TGF $\beta$  se kovalentně váže k latentnímu TGF $\beta$ -vazebnému proteinu (LTBP) (TAIPALE et al.1995). Komplex LAP-TGF $\beta$ -LTBP se váže na extracelulární matrix (HYTTIAINEN et al. 1998). LTBP plní v komplexu funkci lokalizace (váže se k extracelulární matrix), LAP funkci detekce (spouští se přes něj aktivační mechanismus) a TGF $\beta$  funkci efektoru. Aktivátory TGF $\beta$  mohou být proteázy, integrin  $\alpha_v\beta_6$ , reaktivní kyslíky (ROS) a nízké pH (převzato z ANNES et al. 2003)

## 6.2. Charakteristika TGF $\beta$ receptorů

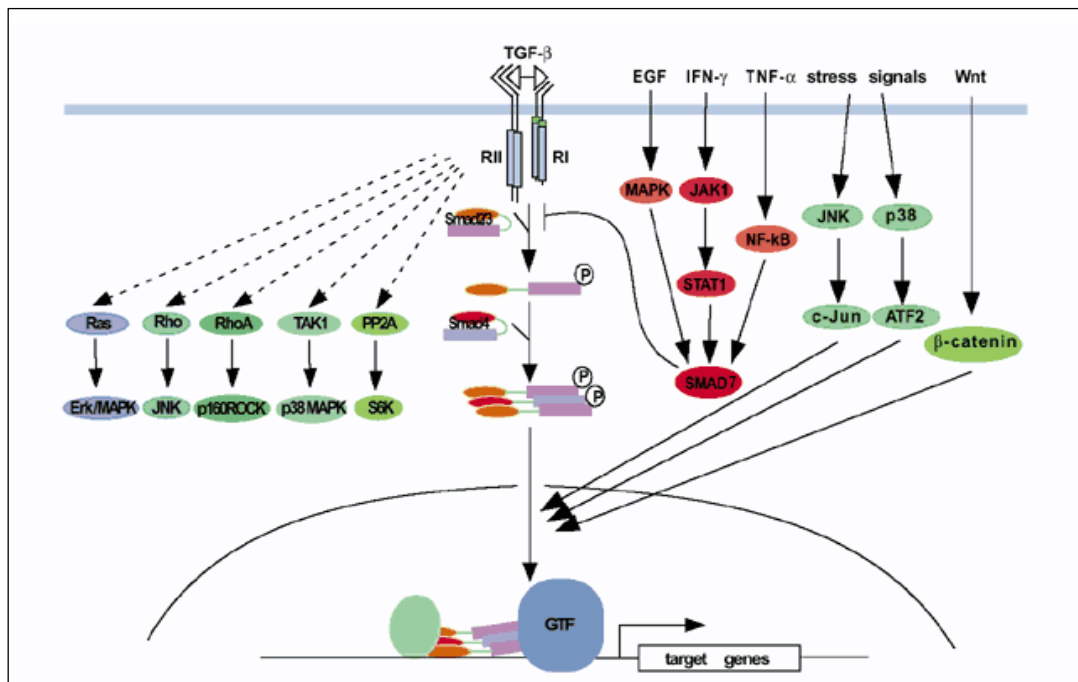
Existují tři typy TGF $\beta$  receptorů. Typ I (T $\beta$ RI) a typ II (T $\beta$ RII) jsou transmembránové serin/threonin kinázy, vazbou TGF $\beta$  se spojí do multimerních receptorů, nejčastěji heterotetramerů. T $\beta$ RI má narozdíl od T $\beta$ RII v transmembránové doméně oblast bohatou na glycin a serin (GS doména). Mezi T $\beta$ RIII patří betaglykan a endoglin. Betaglykan pomáhá T $\beta$ RI a T $\beta$ RII rozpoznávat TGF $\beta$ . Přesná funkce endoglinu není známá, ale má vliv na signalizaci přes TGF $\beta$  receptory ( Lebrin, F. et al. 2004).

První objevená TGF $\beta$  signální dráha vedla přes Smad proteiny. Začíná vazbou TGF $\beta$  na T $\beta$ RII, který fosforyluje GS oblast na T $\beta$ RI. Aktivní ALK5 (activin-like kinase) T $\beta$ RI fosforyluje R-Smads (receptorem-regulované Smads- Smad2 a Smad3 ) a uvolňuje je z cytoplazmatických kotvících proteinů jako je např. SARA (SMAD kotva pro aktivaci receptorem). Fosforylované R-Smads tvoří heteromultimerní komplex s co-Smads (běžné-zprostředkovávající Smads - Smad4) a vstupují pomocí importinů do jádra, kde ovlivňují transkripci cílových genů (znázorněno na obrázku č.1). Mezi cílové geny patří např. INK4B kódující p15 (Li et al. 1995) a WAF1 kódující p21 (Elbendary et al. 1994). P15 a p21 jsou inhibitory cyklin dependentní kinázy (CDK). Inhibice CDK blokuje fosforylaci pRB (retinoblastoma protein), čímž dojde k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi.



Smad signální dráha je regulována na mnoha úrovních, jednou z regulací je zpětnovazebná inhibice, kdy Smad komplex aktivuje geny pro inhibiční Smad (Smad6, Smad7), které blokují vazebné místo pro R-Smad na aktivovaném T $\beta$ RI. Smad7 váže také ubiquitin-ligázu Smurf, která směřuje receptory do proteazómu. Inhibiční Smad mohou být aktivovány také extracelulárními ligandy (např. INF $\gamma$ ). Na inhibici a regulaci signalizace se dále podílí řada intracelulárních faktorů.

Mezi další signální dráhy patří ERK (extracelulární signál-regulující kináza), JNK (c-Jun NH $_2$ -terminální kináza), MAPK (p38 mitogenem-aktivovaná protein kináza), PI $_3$ K (fosfatidylinositol-3 kináza) a Rho GTPáza (převzato z Derynck et al. 2001), (znázorněno na obrázku č.1).



**Obrázek č.1: TGF $\beta$  signalizace**

Po aktivaci receptoru vazbou TGF $\beta$  dojde k přechodné interakci Smad2 a Smad3 s T $\beta$ RI, kterou stabilizuje protein SARA. T $\beta$ RI fosforyluje C konec Smad2 a Smad3, které se poté uvolní z receptoru a vytvoří heteromerní komplex se Smad4. Tento komplex translokuje do jádra, kde ovlivňuje expresi řady genů. Smad7 inhibuje aktivaci Smad2 a Smad3. Exprese Smad7 je indukována stimulací jedné z mnoha signálních drah, např. v odpovědi k EGF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Smad signální dráhu reguluje několik dalších signálních drah, např. stresovými signály aktivovaná JNK a p38 MAP kinázová signalizace či  $\beta$ -catenin signalizace indukovaná Wnt proteiny. TGF $\beta$  také indukuje aktivaci Ras, RhoB, RhoA, TAK1 a protein fosfatázy 2A, které vedou k aktivaci několika MAPK drah (převzato z DERYNCK et al. 2001).

### 6.3. Role TGF $\beta$ při nádorové transformaci

TGF $\beta$  má při karcinogenezi dvojí roli, v časné fázi slouží jako nádorový supresor, během růstu nádoru přestanou být nádorové buňky citlivé k inhibičním signálům TGF $\beta$  díky mutační inaktivaci nebo deregulaci nějaké z části TGF $\beta$  signální dráhy a samy buňky produkují velká množství TGF $\beta$ . Tento TGF $\beta$  potom slouží jako nádorový promotor, stimuluje angiogenezi, imunosupresi a syntézu extracelulární matrix, která poskytuje nádoru vhodné mikroprostředí pro rychlý růst a metastáze. Také způsobuje epiteliální-mezenchymální transformaci (EMT), při které dochází ke ztrátě epiteliálních vlastností buněk a změně na migrační fenotyp (převzato z GOTZMANN et al. 2004), (znázorněno na obrázku č.2). Dvojí role TGF $\beta$  byla jasně prokázána pokusem, kdy vysoká exprese TGF $\beta$  v keratinocytech zpočátku inhibovala vznik nádorů vyvolaných chemickým karcinogenem, ale později způsobovala progresi nádoru (CUI et al. 1996) .

#### 6.3.1. Mutace v TGF $\beta$ signální dráze

Signální dráha TGF $\beta$ , která vede k inhibici růstu a apoptotóze, je u nádorů přerušena mutacemi. Ve většině případů se jedná o mutace sporadické, řídce se objevují i mutace germinální vedoucí k nádorovým predispozicím. U většiny nádorů ale zůstávají nějaké komponenty TGF $\beta$  signální dráhy funkční a mohou významně ovlivňovat karcinogenezi.

V lidských nádorech byly nalezeny mutované geny pro 4 z 5-ti hlavních proteinů TGF $\beta$  signální dráhy (T $\beta$ RI, T $\beta$ RII, Smad2 a Smad4). Mutace v T $\beta$ RI se u nádorů nacházejí jen velmi zřídka (GOGGINS et al. 1998), zatímco T $\beta$ RII je často mutován ve specifické mikrosatelitní sekvenci u colorektálních nádorů a nádorů žaludku, k mutaci dochází inzercí či delecí 1-2 adeninů v 10bp polyadeninovém traktu v extracelulární doméně T $\beta$ RII (LU et al. 1996). Tato mutace vede ke snížení stability mRNA a pokud dojde k translaci, vznikne zkrácený neaktivní receptor. Mutace v T $\beta$ RII se nacházejí např. také u nádorů prsu (SUN et al. 1994), plic (DE JONGE et al. 1997), krku a hlavy (GARRIGUE-ANTAR et al. 1995). Geny pro Smad2 a Smad4 se nacházejí na chromozomu 18q21, tato oblast často prodělává alelické ztráty v mnoha typech nádorů. Smad4 je homozygotně deletován v 50% pankreatických nádorů (v 90% případů se tyto

mutace vyskytují na chromozomu 18q), v 10% všech colorektálních nádorů a ve 30% metastázických colorektálních nádorů (MIYAKI et al. 1999).

U jiných nádorů byl mutovaný Smad4 nalezen s menší frekvencí. Mutovaný Smad2 byl nalezen např. u nádorů colorektálních (EPPERT et al. 1996), nádorů plic (UCHIDA et al. 1996) a děložního čípku (MALIEKAL et al. 2003).

Mutovaný Smad3 nebyl prozatím nalezen v žádném lidském nádoru, ale u myši s deletovaným Smad3 byly pozorovány ve velké míře metastáze colorektálního nádoru (ZHU et al. 1998).

### **6.3.2. Potlačení protinádorové imunitní odpovědi**

Sekrece TGF $\beta$  nádorovými buňkami či buňkami jeho mikrookolí potlačuje protinádorovou imunitní odpověď. Hlavním cílem jsou T lymfocyty, které mohou během imunitní odpovědi diferencovat v cytotoxické T lymfocyty (CTL) či pomocné T lymfocyty (Th<sub>1</sub> a Th<sub>2</sub>). U TGF $\beta$ 1 deficientních myši se objevily spontánně aktivované T lymfocyty a tyto myši umíraly na masivní záněty orgánů (DIEBOLD et al. 1995).

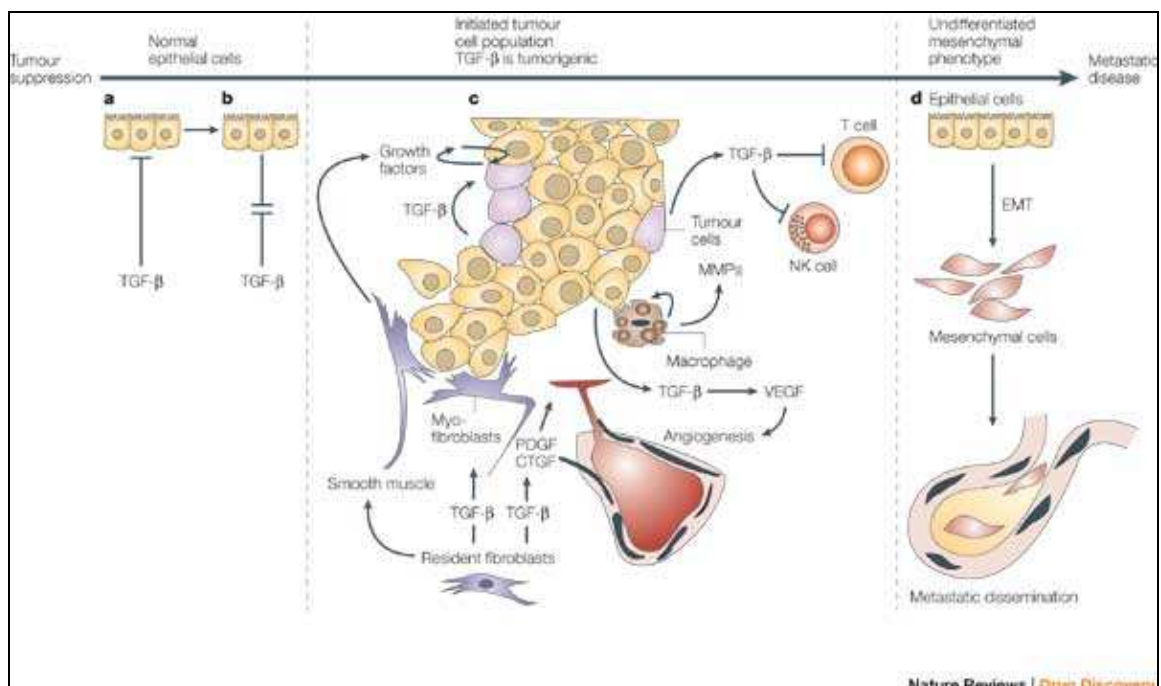
Jeden z prvních pokusů, dokazujících potlačení CTL produkcí TGF $\beta$ , bylo zjištění, že buňky fibrosarkomu sekretující TGF $\beta$  jsou rezistentní k CTL (TORRE-AMIONE et al. 1990). Thomas a Massaqué (2005) zjistili, že TGF $\beta$  potlačuje vznik granzymu A, granzymu B, perforinu, FasL a IFN $\gamma$ , to znamená molekul důležitých pro cytotoxickou odpověď. Nejdůležitější je ale inhibice proliferace T lymfocytů díky snížení exprese interleukinu 2. Je také známo, že TGF $\beta$  má pozitivní vliv na vývoj regulačních T lymfocytů (T<sub>reg</sub>). V nádorech bylo působením TGF $\beta$  zjištěno zvýšené množství T<sub>reg</sub>, které potlačovaly aktivitu CTL a NK buněk (WOLF et al. 2003, CURIEL et al. 2004).

Dalším imunosupresivním působením TGF $\beta$  je snížení aktivace T lymfocytů díky negativnímu efektu na antigen prezentující buňky (APC), např. inhibuje maturaci dendritických buněk během imunitní odpovědi (STROBL and KNAPP 1999). TGF $\beta$  inhibuje expresi MHCgp II inhibicí exprese transaktivátorů II. třídy přes Smad3-dependentní mechanismus (DONG et al. 2001).

TGF $\beta$  může zastavit stimulované B lymfocyty v G1 fázi buněčného cyklu (BOUCHARD et al. 1994) a inhibovat přesmyk membránově vázaných imunoglobulinů na imunoglobuliny sekretované (KEHRL et al. 1991).

### 6.3.3. Podpora angiogeneze

Angiogeneze je nezbytná pro růst nádorů, jejich invazi a metastáze. TGF $\beta$  podporuje expresi několika angiogenních faktorů jako jsou např. VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a CTGF (růstový faktor pojivových tkání). Při studiích několika nádorů byl prokázán pozitivní vliv TGF $\beta$  na angiogenezi, např. rozpustné T $\beta$ Rs, které vychytávaly TGF $\beta$  u myši s nádorem prsní žlázy, snižovaly vznik metastáz v plicích (BANDYOPADHYAY et al. 1999, MURAOKA et al. 2002).



**Obrázek č.2: Role TGF $\beta$  v nádorovém mikrookolí.**

**a)** Normální epiteliální buňky jsou citlivé k inhibičním signálům TGF $\beta$ , ale může dojít k iniciaci karcinogeneze a následně ke ztrátě citlivosti k TGF $\beta$ . **b)** Dojde ke zvýšené expresi TGF $\beta$  a ke změně jeho funkce, z nádorového supresoru se stane nádorový promotor. **c)** Pronádorový efekt TGF $\beta$  zahrnuje zvýšenou syntézu VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) vedoucí k angiogenezi, potlačení funkce T a NK buněk, zvýšení produkce PDGF (růstový faktor krevních destiček) a CTGF (růstový faktor pojivových tkání) a produkci MMPs (metaloproteinázy), které přispívají k degradaci extracelulární matrix a invazi nádorových buněk. **d)** TGF $\beta$  přispívá k EMT (epiteliální-mezenchymální transformace) nádorových buněk, umožňující migraci, extravazaci a šíření metastáz. Terapie cílená na TGF $\beta$  signální dráhu moduluje tyto pronádorové efekty TGF $\beta$  v buňkách nádoru a jeho mikrookolí. (převzato z Yingling et al. 2004).

#### 6.4. Terapie nádorů- blokování TGFβ signální dráhy

Jedním ze způsobů, jak kontrolovat růst nádoru a metastáze, je blokování TGFβ signální dráhy v pokročilých stádiích karcinogeneze. Používání TGFβ antagonistů je však riskantní díky dvojí roli TGFβ. U nádorů, kde stále slouží jako nádorový supresor, může dojít k urychlení růstu a vzniku metastáz. Tato terapie vyžaduje pečlivý výběr pacientů, měřítkem může být např. množství TGFβ v plazmě, nádorová exprese TβRII či nádorové predispozice.

V preklinických pokusech se dnes zkoumají monoklonální protilátky, rozpustné receptory, dominantní negativní receptory a antisense oligonukleotidy, které jsou přímo cílené na TGFβ, či malé molekuly inhibující funkce receptorových kináz.

Použití rozpustné extracelulární domény TβRII (sTβRII) při terapii mnoha nádorů myší vedlo ke snížení metastáz a inhibici angiogeneze. Např. transgenní myši exprimující fúzní protein sTβRII:Fc po intravenózním podání izogenních melanomových buněk nevyvinuly na rozdíl od kontrolních myší metastáze. Navíc celoživotní exprese sTβRII u těchto myší neovlivnila jeho regulační roli v normálních tkáních (YANG et al. 2002).

sTβRII má ale přibližně 10krát nižší afinitu k TGFβ než TβRII (LIN et al. 1995), což může být způsobeno monomerní formou rozpustného receptoru. Dnes se používá chimerický protein sTβRII:Fc, který má stejné vlastnosti jako přirozený receptor. Tento chimerický protein postrádá transmembránovou doménu TβRII, ale obsahuje cysteinové zbytky pantové oblasti těžkého řetězce IgG, díky nimž může být sekretován z buněk ve formě dimeru, viz. kapitola č.7.

Dominantní negativní receptory (DNR) jsou zkráceny o intracelulární doménu a inhibují Smad signální dráhu, ale nemají vliv na p38MAPK, Rho-Rac, Erk či Jnk signální dráhu (převzato z ARTEAGA 2006). V modelu exprimujícím DNRII transgen v lidské buněčné linii nádoru prsu bylo pozorováno snížení metastáz (TANG et al. 2003), ale u nádoru kůže (GO et al. 1999) a prostaty (TU et al. 2003) byly metastáze zvýšeny.

Monoklonální protilátky proti TGFβ redukuje růst nádoru a metastáz díky obnovení imunitní odpovědi (ARTEAGA et al. 1993) či inhibicí angiogeneze, jejich nevýhodou je však špatné pronikání do nádorových tkání.

Používání antisense TGFβ vedlo v mnoha nádorech k obnovení imunitní odpovědi a pacienti byli více vnímaví k různým typům léčby (převzato z IYER et al. 2005). Např. v

modelu ovariálního teratomu u myší vedlo podání antisense TGF $\beta$  a IL12 k vyléčení 69% myší od nádoru (DORIGO et al. 1998). Funkcí malých inhibitorů kináz je ATP-kompetitivní inhibice Alk5 (převzato z ARTEAGA 2006). Tato metoda je však méně selektivní než např. protilátky či antisense RNA.

Inhibice TGF $\beta$  signální dráhy, která pozitivně působí na šíření nádorů, má dobré výsledky v mnoha preklinických pokusech. Ovšem pro vznik bezpečných protinádorových léčiv bude nutné lépe objasnit změnu funkce TGF $\beta$  v průběhu karcinogeneze.

## 7. Fc:IgG1 fúzní proteiny

### 7.1. Charakteristika Fc fragmentu IgG1

Fc fragment IgG se skládá z CH2 a CH3 domény těžkého řetězce IgG a z pantové oblasti (znázorněno na obrázku č.3). Lidské IgG se dělí na podtřídy IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Myší IgG se dělí na podtřídy IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Jednotlivé podtřídy se liší počtem cystinových můstků v pantové oblasti a detaily struktury jednotlivých domén.

Fc fragment vyvolává na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC) a na komplementu závislou cytotoxicitu (CDC). Při ADCC se Fc fragment váže na receptor (Fc $\gamma$ R), který se nachází na povrchu NK buňek, makrofágů, monocytů a granulocytů, což vede k fagocytóze či lyzi cílové buňky. Signalizace přes Fc $\gamma$ R může vést také k apopóze cílových buněk. Při CDC se na Fc fragment váže C1 protein, dojde k sestavení komplementové kaskády a ke smrti buňky. Podtřídy IgG se liší schopností aktivovat ADCC a CDC. Lidský IgG1 zprostředkovává silnou ADCC i CDC, proto je vhodný pro terapeutické použití proti patogenům a nádorovým buňkám (převzato z <http://www.invivogen.com/family.php?ID=164#fcregion>). Myší Fc fragment IgG1 zprostředkovává pouze mírnou CDC a neaktivuje ADCC.

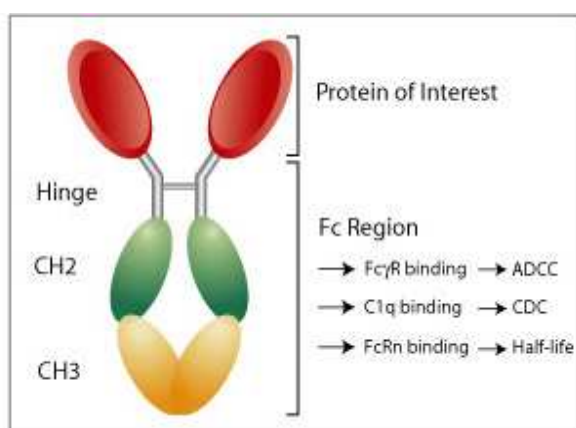
Fc fragment může být upravován za účelem snížení či zvýšení ADCC a CDC. Vazba IgG na Fc $\gamma$ R či na C1 protein závisí na zbytcích v pantovém regionu a v CH2 doméně. Např. substituce v lidském IgG1 za IgG2 zbytky v pozici 233-236 a za IgG4 zbytky v pozici 327,330,331 snižuje ADCC i CDC. Bylo také provedeno mnoho mutací

v CH2 doméně, např. mutace E333A zvyšovala ADCC i CDC (převzato z <http://www.invivogen.com/family.php?ID=164#fcregion>).

Glykosilace v konzervovaných asparaginových zbytcích CH2 domény je nezbytná pro vazbu na FcγR (SHIELDS et al. 2001), např. snížení množství fukózy vedlo ke zvýšení ADCC (SHIELDS et al. 2002).

## 7.2. Fc fúzní proteiny

Fc fragment se dnes v genomovém inženýrství používá pro vznik Fc-fúzních proteinů, kterým uděluje řadu výhod. Tyto chimerické proteiny se skládají z efektorové oblasti proteinu (např. rozpustné receptory) fúzované k Fc fragmentu IgG (znázorněno na obrázku č.3).



**Obrázek č.3: Schématické znázornění Fc fúzního proteinu.**

Fc fragment se skládá z CH2 a CH3 domén těžkého řetězce IgG a z pantové oblasti. Pantová oblast je flexibilní spojka mezi dvěma částmi Fc fúzního proteinu a díky ní může každá část molekuly fungovat nezávisle (převzato z <http://www.invivogen.com/family.php?ID=184#fcregion>).

Jednou z výhod Fc fúzních proteinů je jejich snadná purifikace afinitní chromatografií pomocí proteinu A či proteinu G. Protein A silně váže všechny lidské IgG kromě IgG3. Protilátky se vážou na protein A i G za neutrálních podmínek a mohou být vymyty například použitím pufru o nízkém pH (převzato z GHOSE et al. 2005).

Mezi další výhody patří zvýšení životnosti v cirkulačním systému díky vazbě k FcRn (neonatální Fc-receptor), který je exprimován na povrchu epiteliálních buněk a chrání Fc fragment před lyzozomální degradací. FcRn je příbuzný s MHCgp I a účastní se přenosu IgG z matky na dítě a regulace množství IgG v séru. K vazbě IgG na FcRn dochází v kyselém prostředí endozómu a IgG-FcRn je poté recyklován z lyzozómu zpět do

cirkulace. Takto recyklovaný IgG má zvýšenou životnost v porovnání s ostatními proteiny v séru (převzato z GHETIE and WARD 2000). Úpravy Fc fragmentů pro lepší vazbu k FcRn zvyšují životnost IgG, což má řadu výhod (snížení dávek a nižší cena produktů) pro fúzní proteiny i terapeutické protilátky.

Fc fragment uděluje fúzním proteinům schopnost indukovat ADCC a CDC, které však mohou být pro některé terapeutické účely nežádoucí a potlačeny úpravami Fc fragmentu, viz. kapitola 7.1.

Fc fragment také zvyšuje export fúzních proteinů z buněk a zajišťuje vznik homodimeru, což má např. u T $\beta$ RII:Fc za následek lepší vazbu ligandu. Protein je translatován jako monomer a tvoří disulfidické můstky díky cysteinovým zbytkům na Fc fragmentu, čímž vzniká aktivní homodimer, který je sekretován z buněk.

Strategie využívající fúzi rozpustného cytokinového receptoru k Fc fragmentu má dnes řadu preklinických i klinických úspěchů. Používají se např. rozpustné TNFR:Fc při léčbě řady zánětlivých onemocnění (převzato z GATTO 2006). Stejný přístup využívající sT $\beta$ RII:Fc se zkoumá pro blokování TGF $\beta$  při léčbě řady nemocí a terapii nádorů. Fúzní protein potlačuje vznik metastáz a jeho klinické využití se dnes zkoumá (převzato z ARTEAGA 2006).



## 8. Závěr

Laboratoř experimentální virologie na Ústavu hematologie a krevní transfuze se zabývá vývojem vakcín proti karcinomu cervixu, jehož vznik indukují lidské papillomaviry 16 (HPV 16). Karcinom cervixu je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním žen v celosvětovém měřítku. Virový vektor exprimující sTβRII:Fc by měl posilovat účinnost terapeutické protinádorové vakcíny specifické pro virový onkoprotein E7.

Cílem mé bakalářské práce bylo popsat roli TGFβ v karcinogenezi a zmínit možné postupy terapie nádorů využívající blokování TGFβ signální dráhy se zaměřením na sTβRII:Fc. Dále jsem také popsala virus vakcinie a rekombinantní vektory odvozené od VV. Tomuto tématu se také pod vedením RNDr. Šárky Němečkové, DrSc věnuji v laboratoři rekombinantních vakcín ÚHKT, kde nyní připravuji fúzní gen sTβRII:Fc, který klonuji do rekombinačního plazmidu. Úkolem mé další práce bude použití výsledného plazmidu pro přípravu rekombinantních virů vakcinie s rozdílnou replikační schopností v hostiteli, provedení charakterizace výsledného vektoru i produktu transgenů a sledování vlivu vektoru na vývoj nádorů u myši imunizovaných vakcínou proti E7 HPV16.

## 9. Seznam použité literatury

1. Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B. (2003): Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Scio* 116:217-24.
2. Arteaga, C.L. (2006): Inhibition of TGFbeta signaling in cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev.* 16:30-7.
3. Arteaga, C.L., Hurd, S.D., Winnier, A.R., Johnson, M.D., Fendly, B.M., Forbes, J.T. (1993): Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest.* 92:2569-76.
4. Bandyopadhyay, A., Zhu, Y., Cibull, M.L., Bao, L., Chen, C., Sun, L. (1999): A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Cancer Res.* 59:5041-6.
5. Bouchard, C., Fridman, W.H., Sautes, C. (1994): Mechanism of inhibition of lipopolysaccharide-stimulated mouse B-cell responses by transforming growth factor-beta 1. *Immunol Lett.* 40:105-10.
6. Buller, R.M., Chakrabarti, S., Cooper, J.A., Twardzik, D.R., Moss, B. (1988): Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol* 62:866-74.
7. Christen, L.M., Sanders, M., Willer, C., Niles, E.G. (1998): Vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I is an essential viral early gene transcription termination factor. *Virology* 245:360-71.
8. Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S., Chang, W. (1998): A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72:1577-85.
9. Cui, W., Fowles, D.J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A., Akhurst, R.J. (1996): TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86:531-42.
10. Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Weis, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L., Zou, W. (2004): Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 10:942-9.
11. Derynck, R., Akhurst R.J., Balmain, A. (2001): TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29:117-29.

12. Diebold, R.J., Eis, M.J., Yin, M., Ormsby, I., Boivin, G.P., Darrow, B.J., Saffitz, J.E., Doetschman, T. (1995): Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:12215-9.
13. Dong, Y., Tang, L., Letterio, J.J., Benveniste, E.N. (2001): The Smad3 protein is involved in TGF-beta inhibition of class II transactivator and class II MHC expression. *J Immunol*. 167:311-9.
14. Dorigo, O., Shawler, D.L., Royston, I., Sobol, R.E., Berek, J.S., Fakhrai, H. (1998): Combination of transforming growth factor beta antisense and interleukin-2 gene therapy in the murine ovarian teratoma model. *Gynecol Oncol*. 71:204-10.
15. Eckert, D., Williams, O., Meseda, C.A., Merchlinsky, M. (2005): Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035). *J Virol* 79:15084-90.
16. Elbendary, A., Berchuck, A., Davis, P., Havrilesky, L., Bast, R.C. Jr., Iglehart, J.D., Marks, J.R. (1994): Transforming growth factor beta 1 can induce CIP1/WAF1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells. *Cell Growth Differ*. 5:1301-7.
17. Eppert, K., Scherer, S.W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., Tsui, L.C., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I.L., Thomsen, G.H., Wrana, J.L., Attisano, L. (1996): MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86:543-52.
18. Eppstein, D.A., Marsh, Y.V., Schreiber, A.B., Newman, S.R., Todaro, G.J., Nestor, J.J.Jr. ( 1985,1986):Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection. *Nature* 318:663-5.
19. Garrigue-Antar, L., Munoz-Antonia, T., Antonia, S.J., Gesmonde, J., Vellucci, V.F., Reiss, M. (1995): Missense mutations of the transforming growth factor beta type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res*. 55:3982-7.
20. Gatto, B. (2006): Biologics targeted at TNF: design, production and challenges. *Reumatismo* 58:94-103.
21. Ghetie, V., Ward, E.S. (2000): Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol*. 18:739-66.
22. Ghose, S., Allen, M., Hubbard, B., Brooks, C., Cramer, S.M. (2005): Antibody variable region interactions with Protein A: implications for the development of generic purification processes. *Biotechnol Bioeng*. 92:665-73.
23. Go, C., Li, P., Wang, X.J. (1999): Blocking transforming growth factor beta signaling in transgenic epidermis accelerates chemical carcinogenesis: a mechanism associated with increased angiogenesis. *Cancer Res*. 59:2861-8.

24. Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C.J., Hruban, R.H., Kern, S.E. (1998): Genetic Alterations of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Genes in Pancreatic and Biliary Adenocarcinomas. *Cancer Res.* 58:5329-5332.
25. Gotzmann, J., Mikula, M., Eger, A., Schulte-Hermann, R., Foisner, R., Beug, H., Mikulits, W. (2004): Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res.* 566:9-20.
26. Henderson D.A., Moss B. (1999): Smallpox and Vaccinia, V: Plotkin S.A., Orenstein W.A. ( eds.): *Vaccines*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Chapter 6.
27. Heuser, J. (2005): Deep-etch EM reveals that the early poxvirus envelope is a single membrane bilayer stabilized by a geodetic "honeycomb" surface coat. *J Cell Biol* 169:269-83.
28. Hsiao, J.C., Chung, C.S., Chang, W. (1999): Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* 73:8750-61.
29. Hyytiainen, M., Taipale, J., Heldin, CH., Keski-Oja, J. (1998): Recombinant latent transforming growth factor beta-binding protein 2 assembles to fibroblast extracellular matrix and is susceptible to proteolytic processing and release. *J Biol Chem* 273:20669-76.
30. Ishii, K., Moss, B. ( 2002): Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex. *Virology* 303:232-9.
31. Iyer, S., Wang, Z.G., Akhtari, M., Zhao, W., Seth, P. (2005): Targeting TGFbeta signaling for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 4:261-6.
32. de Jonge, R.R., Garrique-Antar, L., Vellucci, V.F., Reiss, M. (1997): Frequent inactivation of the transforming growth factor beta type II receptor in small-cell lung carcinoma cells. *Oncol Res.* 9:89-98.
33. Kehrl, J.H., Thevenin, C., Rieckmann, P., Fauci, A.S. (1991): Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J Immunol.* 146:4016-23.
34. de Larco, J.E., Todaro, G.J. (1978): Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75:4001-5.
35. Lebrin, F., Goumans, M.J., Jonker, L., Carvalho, R.L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H.M., ten Dijke, P. (2004): Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo J* 23:4018-28.

36. Li, J.M., Nichols, M.A., Chandrasekharan, S., Xiong, Y., Wang, X.F. (1995): Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. *J Biol Chem.* 270:26750-3.
37. Lin, H.Y., Moustakas, A., Knaus, P., Wells, R.G., Henis, Y.I., Lodish, H.F. (1995): The soluble extracellular domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. *J Biol Chem* 270:2747-54.
38. Lu, S.L., Zhang, W.C., Akiyama, Y., Nomizu, T., Yuasa, Y. (1996): Genomic structure of the transforming growth factor beta type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res.* 56:4595-8.
39. Maliekal, T.T., Antony, M.L., Nair, A., Paulmurugan, R., Karunagaran, D. (2003): Loss of expression, and mutations of Smad 2 and Smad 4 in human cervical cancer. *Oncogene.* 22:4889-97.
40. Mayr, A., Stickl, H., Muller, H.K., Danner, K., Singer, H. (1978): The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism. *Zentralbl Bakteriologie (B)* 167:375-90.
41. Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., Hishima, T., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., Utsunomiya, J., Kuroki, T., Mori, T. (1999): Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene.* 18:3098-103.
42. Moss B. (2001): Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.): *Fields Virology*, 4th edition, 2849-2883
43. Muraoka, R.S., Dumont, N., Ritter, C.A., Dugger, T.C., Brantley, D.M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L.R., Ryan, S., Gotwals, P.J., Kotliansky, V., Arteaga, C.L. (2002): Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J Clin Invest* 109:1533-6.
44. Oda, K.I., Joklik, W.K. (1967): Hybridization and sedimentation studies on "early" and "late" vaccinia messenger RNA. *J Mol. Biol* 27:395-419.
45. Sanderson, C.M., Way, M., Smith, G.L. (1998): Virus-induced cell motility. *J Virol* 72:1235-43.
46. Schutz, A., Oertli, D., Marti, W.R., Noppen, C., Padovan, E., Spagnoli, G.C., Heberer, M., Zajac, P. (2001): Immunogenicity of nonreplicating recombinant vaccinia expressing HLA-A201 targeted or complete MART-1/Melan-A antigen. *Cancer Gene Ther* 8:655-61.
47. Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H., Presta, L.G. (2002): Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves

- binding to human Fc $\gamma$  RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277:26733-40.
48. Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A., Presta, L.G. (2001): High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc  $\gamma$  RI, Fc  $\gamma$  RII, Fc  $\gamma$  RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc  $\gamma$  R. *J Biol Chem* 276:6591-604.
  49. Strobl, H., Knapp, W. (1999): TGF- $\beta$ 1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1:1283-90.
  50. Sun, L., Wu, G., Willson, J.K., Zborowska, E., Yang, J., Rajkarunanayake, I., Wang, J., Gentry, L.E., Wang, X.F., Brattain, M.G. (1994): Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 269:26449-55.
  51. Taipale, J., Lohi, J., Saarinen, J., Kovanen, P., Keski-Oja, J. (1995): Human Mast Cell Chymase and Leukocyte Elastase Release Latent Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 from the Extracellular Matrix of Cultured Human Epithelial and Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 270:4689-4696.
  52. Tang, B., Vu, M., Booker, T., Santner, S.J., Miller, F.R., Anver, M.R., Wakefield, L.M. (2003): TGF- $\beta$  switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest.* 112:1116-24.
  53. Thomas, D.A., Massaqué J. (2005): TGF- $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* 8:369-80.
  54. Thorne, S.H., Bartlett, D.L., Kirn, D.H. (2005): The use of oncolytic vaccinia viruses in the treatment of cancer: a new role for an old ally? *Curr. gene Ther.* 5:429-43.
  55. Timiryasova, T.M., Chen, B., Fodor, I. (2001): Replication-deficient vaccinia virus gene therapy vector: evaluation of exogenous gene expression mediated by PUV-inactivated virus in glioma cells. *J Gene Med* 3:468-77.
  56. Torre-Amione, G., Beauchamp, R.D., Koeppen, H., Park, B.H., Schreiber, H., Moses, H.L., Rowley, D.A. (1990): A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:1486-90.
  57. Tu, W.H., Thomas, T.Z., Masumori, N., Bhowmick, N.A., Gorska, A.E., Shyr, Y., Kasper, S., Case, T., Roberts, R.L., Shappell, S.B., Moses, H.L., Matusik, R.J. (2003): The loss of TGF- $\beta$  signaling promotes prostate cancer metastasis. *Neoplasia.* 5:267-77.

58. Uchida, K., Nagatake, M., Osada, H., Yatabe, Y., Kondo, M., Mitsudomi, T., Masuda, A., Takahashi, T., Takahashi T. (1996): Somatic *in vivo* alterations of the JV18-1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* 56:5583-5.
59. Van Eijl, H., Hollinshead, M., Rodger, G., Zhang, W.H., Smith, G.L. (2002): The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. *J Gen Virol* 83:195-207.
60. Ward, B.M., Moss, B. (2004): Vaccinia virus A36R membrane protein provides a direct link between intracellular enveloped virions and the microtubule motor kinesin. *J Virol* 78:2486-93.
61. Wolf, A.M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., Grubeck-Loebenstien, B. (2003): Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* 9:606-12.
62. Yang, Y.A., Dukhanina, O., Tang, B., Mamura, M., Letterio, J.J., MacGregor, J., Patel, S.C., Khozin, S., Liu, Z.Y., Green, J., Anver, M.R., Merlino, G., Wakefield, L.M. (2002): Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J Clin Invest.* 109:1607-15.
63. Yingling, J.M., Blanchard, K.L., Sawyer, J.S. (2004): Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat rev Drug Discov.* 3:1011-22.
64. Young, L.S., Searle, P.F., Onion, D., Mautner, V. (2006): Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 208:299-318.
65. Zhu, Y., Richardson, J.A., Parada, L.F., Graff, J.M. (1998): Smad3 Mutant Mice Develop Metastatic Colorectal Cancer. *Cell* 94:703-14.